

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2021

課題番号：16K08425

研究課題名（和文）味受容機構を利用したバイオセンサの開発と製剤設計への応用

研究課題名（英文）The development of the biosensor using taste reception mechanism and application to a preparation design

研究代表者

吉田 都 (Yoshida, Miyako)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：20369028

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：現在、特定の味を定量的に評価する味覚センサは、開発されているが、全ての医薬品もしくは開発段階の薬物の苦味評価ができるまでには至っていないのが現状である。本研究では、医薬品の苦味受容反応を定量的苦味受容体および電位依存性プロトンチャネルを共発現させた細胞を用いたバイオセンサによる医薬品の定量的苦味受容反応および時間依存的苦味受容反応の評価方法を確立した。生体物質を利用したバイオマテリアルセンサにより、従来のバイオミメティックセンサよりも生体反応に近い苦味評価を行うことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般に普及している味覚センサは味蕾細胞に見立てた細胞膜成分と苦味物質との結合を *in vitro* で評価した系であり、全ての医薬品の苦味を測定できていないのが現状である。そこで本研究では、苦味受容体と苦味物質の結合により味蕾細胞内の情報伝達系が活性化された結果生ずるチャネルを経た細胞内外へのイオンの移動に伴う膜電位の変化を利用して苦味を評価する。膜電位依存性プロトンチャネルの共発現により、膜電位変化が大きくなり、苦味受容反応の検出が容易となる。この苦味評価系を用いて、小児科領域での利用される口腔内崩壊性を付与したミニタブレットなどの新規機能性製剤の開発につながる。

研究成果の概要（英文）：The taste sensor evaluating specific taste quantitatively is developed, but it is the current situation now that does not reach it before there the bitterness evaluation of all pharmaceutical products or under development drug. In this study, the evaluation method of the quantitative bitterness reception reaction of the pharmaceutical products was established with the bio sensor using the cell coexpressed bitterness receptor and a voltage-dependent proton channel. By a biomaterial sensor using the living body material, vital reaction was able to evaluate near bitterness than a conventional biomimetic sensor.

研究分野：臨床製剤学分野

キーワード：味覚センサ

1. 研究開始当初の背景

医薬品の苦味は患者にとって苦痛であり、コンプライアンス、QOLの低下につながる。多くの製剤で医薬品の苦味を抑制する技術(苦味マスキング)が施されているが、苦味を抑制できていない製剤や、処方上の都合上、粉碎した医薬品を服用する場合などには強い苦味を伴うことになる。また、低含量製剤の液剤化や小児用製剤、口腔内崩壊錠において、医薬品の苦味が問題になることがある。FDA(Food and Drug Administration; アメリカ食品医薬品局)は、臨床試験でのプラセボとの味の盲検性について味覚センサの利用推進を提唱しており、国外、国内問わず、多くの製薬企業で味覚センサを導入している。研究代表者が所属している武庫川女子大学薬学部臨床製剤学講座は、医薬品の苦味測定に関しては先駆的な存在として苦味を測定するための味覚センサが完備されており、測定技術が確立されている。しかしながら、現在のところ、味覚センサを用いることで全ての医薬品の苦味を測定できるというわけではない。苦味物質によっては、味覚センサに反応しにくい物質もあり、測定結果に関しては、ヒト官能試験との相関性を考慮することが必要となってくる。従って、麻薬性鎮痛薬や向精神薬などヒト官能試験を行い難い医薬品に関しては、苦味の評価が困難であるという問題がある。また、現在多くの施設に導入されている味覚センサは、味蕾細胞に見立てた細胞膜成分と苦味物質との結合を *in vitro* で評価した系である。味蕾細胞中の味受容体と呈味物質と結合によって味受容が行われているため、全ての味受容反応を厳密に評価しているとは言い難いのが現状である。

2. 研究の目的

研究代表者は、これまでに苦味受容体と苦味物質との結合性を利用した苦味評価方法を確立した。この方法を用いると、従来の細胞膜成分と苦味物質との結合を *in vitro* で評価した味覚センサと比べると感度が上がり、従来の味覚センサでは測定できなかった医薬品の苦味も測定可能となった。しかしながら、味覚味蕾細胞を用いる場合、動物から味蕾細胞を摘出し、培養し、苦味測定可能な状態とするまでに時間およびコストがかかり、汎用性が低いことが難点として挙げられる。また、そこで本研究では、より簡便な味覚評価系の確立を目的として、苦味受容体および電位依存性プロトンチャネルを共発現させた細胞を用いたバイオセンサによる医薬品の定量的苦味受容反応および時間依存的苦味受容反応の評価方法の確立を行う。すなわち、苦味受容体と苦味物質との結合により、味蕾細胞内の情報伝達系が活性化された結果生ずるチャネルを経た細胞内外へのイオンの移動に伴う膜電位の変化を利用して苦味を評価する。電位依存性プロトンチャネルを共発現させることによって、膜電位変化が大きくなり、苦味受容反応の検出が容易となる。膜電位依存性プロトンチャネル、VSOP1(Voltage-sensordomain only protein1)ノックアウトマウスのマクロファージおよび好中球では膜電位に依存したプロトン電流が消失することを確認されている。この膜電位依存性プロトンチャネルの共発現により、苦味受容体と苦味物質との結合によって生じる膜電位変化が大きくなり、膜電位測定による苦味受容反応の検出が容易となる。苦味受容体と苦味物質との結合性を評価する手段としては、細胞内シグナル伝達をELISAや蛍光タンパクと結合したセカンドメッセンジャーを共焦点顕微鏡で評価する方法もあるが、膜電位測定法が確立すれば、最もランニングコストを抑えた評価方法を確立することができる。汎用性のあるバイオセンサとして開発する上で本研究は有用である。現在、特定の味を定量的に評価する味覚センサは、開発されているが、全ての医薬品もしくは開発段階の薬物の苦味評価ができるまでには至っていないのが現状である。研究代表者が申請する本研究は、医薬品の苦味受容反応を定量的にだけでなく、時間依存的にも評価し、苦味マスキング効果を予測する方法を確立することができる。このパラメータの探索し、苦味反応予測式を確立し、論文・学会等で公表することによって、全ての医薬品の苦味が測定出来なかった原因であると考えられる、従来の味覚センサの反応と生体に苦味受容反応のミスリンク部分のパラメータが明らかとなり、更に汎用性に富んだ新規の味覚センサ開発につながる可能性がある。さらにその結果から苦味マスキング技術への応用を試みる。小児科領域において、国内では液剤よりも散剤、顆粒剤などの固形製剤が多い。顆粒剤の場合はドライシロップ剤(糖類で顆粒をコーティングして苦味マスキングしている製剤)も開発されているが、コーティングしている糖が剥げてしまうと口の中で苦味を呈すること、また、糖類でコーティングしているため、吸湿性が高くなり、保管時の医薬品の安定性が悪くなる等の問題点がある。国外では小児製剤としてはミニタブレットが開発されているが、矯味のための技術は施されていない。苦味マスキング技術を施し、更に口腔内崩壊性の機能を付与したミニタブレットが確立すれば、世界市場に目を向けた製剤開発につながると思われる。

3. 研究の方法

1) ヒト苦味受容体および電位依存性プロトンチャネルを共発現させた細胞の取得

Gα15 および VSOP 安定発現細胞を取得した後、それをベースにヒト苦味受容体安定発現細胞を作成した。効率よく Gα15 および VSOP 安定発現細胞を取得するために、Flip-in システムを用いた。Flip-in-293 細胞は FRT サイトが組み込まれており、pcDNA5/FRT および pOG44(FRT リコンビナーゼ)でトランスフェクションすることにより、細胞のゲノム上の DNA の特定部位に目的の遺伝子を導入できる。更に、Flip-in-293 細胞はゼオシン耐性であるが、FRT サイトに正しく組み換えが起こるとゼオシン耐性遺伝子が破壊され pcDNA5/FRT 由来のハイグロマイシン耐性が有効となる。Gα15 および VSOP を pcDNA5/FRT にサブクローニングし、DNA シーケンスにより塩基配列に誤りがないことを確認した後、Flip-in-293 細胞のトランスフェクションに供した。Flip-in-293 細胞のトランスフェクションは、PEI を用いて行った。トランスフェクション細胞をハイグロマイシン耐性・ゼオシン感受性スクリーニングすることにより、Gα15 および VSOP 安定発現細胞を得た。ヒト苦味受容体については、ヒト苦味受容体の中でも医薬品の苦味を評価する上で従来の味覚センサ出力と相関のあった hTAS2R14 と hTAS2R10 の 2 つのサブタイプを選択した。苦味受容体は、N 末端の細胞外領域が極端に短いため、受容体単独では細胞膜への局在化が困難であり、N 末端にシグナルペプチドとなるペプチド配列を付加する必要があることが知られている。本研究ではマウスロドプシンの N 末端 38 アミノ酸残基を hTAS2R14 または hTAS2R10 の先端に連結させた。pcDNA3.1(G418^r)にサブクローニングし、hTAS2R14 または hTAS2R10 のベクターとし、Gα15 および VSOP 安定発現細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション細胞をハイグロマイシン耐性・G418 耐性スクリーニングすることにより、Gα15 および VSOP 安定発現細胞を得た。Gα15、hTAS2R14 または hTAS2R10 のタンパク発現は免疫染色により確認した。

2) バイオセンサ膜の作製とそれを用いた膜電位変化の測定

細胞培養用シャーレにポリ塩化ビニルをコーティングする。これは、従来の味覚センサで用いているセンサ膜の基剤である。更にコラーゲンを重層し、乾燥させた。このシャーレに苦味受容体 hTAS2R14 または hTAS2R10 と膜電位依存性プロトンチャネル VSOP1 を共発現した細胞を播種し、培養する。細胞がコンフルエントになったら、シャーレから膜ごと剥がし、センサチップに固定した。苦味を呈する医薬品との定量的な結合を、苦味を呈する医薬品溶液と接触する前と接触後の膜電位の変化で評価する。これは、苦味を呈する医薬品を口に含んだ時に感じる苦味(先味)として評価する。苦味を呈する医薬品溶液を洗浄した後もさらに膜電位変化を評価した。これは、苦味を呈する医薬品を嚥下後に感じる苦味(後味)として評価した。先味と後味の比から受容体への吸着性を評価した。まず、苦味の基準物質として、苦味の官能試験時に教師用サンプル(基準サンプル)として用いるキニーネ塩酸塩を用いて定量的苦味受容反応の評価における濃度等の測定条件を確立した。同時に官能試験も行い、本評価系と官能試験との定量性の相関を検討した。

3) 医薬品の共結晶化およびその苦味評価と物性評価

小児科領域で汎用される苦味を呈する医薬品に関して、確立したバイオセンサを用いて、各医薬品原末と共結晶化することにより苦味マスキング可能となる化合物を探索した。小児科領域で汎用される苦味を呈する医薬品としてトリメトプリムを選択し、苦味マスキング可能となる化合物を探索したところ、旨味成分であるコハク酸、イノシン酸、アデニン酸、グアニル酸などが候補として挙げられた。この中でも安価で入手しやすいコハク酸を苦味マスキング剤として、苦味マスキング剤と医薬品に関して、Evaporation cocrystallisation にて共結晶化を試みた。共結晶化した後はその結晶について、共結晶化する前に比べて苦味がマスキングされていることを確認した。更に、溶解性や安定性などの物性についてもデータをとった。

4. 研究成果

苦味受容体および電位依存性プロトンチャネルを共発現させた細胞を用いたバイオセンサによる医薬品の定量的苦味受容反応および時間依存的苦味受容反応の評価方法の確立を行った。確立後は網羅的に医薬品の苦味受容反応の評価を行った。医薬品の構造、溶解性、脂溶性等の物性と苦味受容体への結合性や親和性についてデータベース化することによって医薬品の苦味受容反応のパラメータを探索した。医薬品の苦味で問題となるのは、小児製剤である。小児製剤として汎用されている強い苦味を呈する医薬品としてトリメトプリムを選択し、苦味をマスキングすると考えられる化合物と医薬品との共結晶化を試みた。すなわちコハク酸を苦味マスキング剤として、苦味マスキング剤と医薬品に関して、Evaporation cocrystallisation にて共結晶化を試みた。共結晶化した後はその結晶について、共結晶化する前に比べて苦味がマスキングされていることを確認した。更に、溶解性や安定性などの物性についてもデータをとった。さらに、共結晶化した医薬品について、口腔内崩壊性を付与したミニタブレット化について検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshida M., Kojima H., Uda A., Haraguchi T., Ozeki M., Kawasaki I., Yamamoto K., Yano I., Hirai M., Uchida T.	4. 巻 67
2. 論文標題 Bitterness-Masking Effects of Different Beverages on Zopiclone and Eszopiclone Tablets.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chem Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 404-409
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c18-00502	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Haraguchi T, Uchida T, Yoshida M, Kojima H, Habara M, Ikezaki H.	4. 巻 66
2. 論文標題 The utility of the artificial taste sensor in evaluating the bitterness of drugs: correlation with responses of human TASTE2 receptors (hTAS2Rs)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chem Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 71-77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiraishi S, Haraguchi T, Nakamura S, Kojima H, Kawasaki I, Yoshida M, Uchida T.	4. 巻 65
2. 論文標題 Suppression in bitterness intensity of bitter basic drug by chlorogenic acid.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chem. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 151 - 156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiraishi S, Haraguchi T, Nakamura S, Dahong Li, Kojima H, Yoshida M, Uchida T.	4. 巻 65
2. 論文標題 Taste-masking effect of Chlorogenic acid (CGA) on bitter drugs evaluated by taste sensor and surface plasmon resonance on the basis of CGA-drug interactions.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chem. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 127 - 133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Uchida T., Okuno T., Haraguchi T., Kojima H., Ikegami S., Yoshida M.
2. 発表標題 Factors of bitterness in clinical medicines for pediatric patients evaluated by correlation between physicochemical properties or biopharmaceutics classification and taste sensor responses
3. 学会等名 AAPS（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原口珠実、小島穂菜美、吉田都、内田享弘
2. 発表標題 小児用必須医薬品の苦味と物性の相関性評価
3. 学会等名 日本薬剤学会第33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haraguchi T., Kojima H., Nakamura S., Yoshida M., Uchida T.
2. 発表標題 Taste masking evaluation of combination Amlodipine besylate and Valsartan using taste sensor and human sensation test.
3. 学会等名 CRS（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原口珠実、中村早貴、白石早祐子、小島穂菜美、吉田都、内田享弘
2. 発表標題 味覚センサと ¹ H-NMRを用いた降圧薬2種混合による医薬品原末の苦味抑制効果とその機序の解明
3. 学会等名 日本薬学会第137年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Haraguchi T., Nakamura S., Kojima H., Yoshida M., Uchida T.
2. 発表標題 Bitterness intensity of medicin clud be masked efficiently by combination of drugs on taste sensor and human volunteers
3. 学会等名 PSWC (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kojima H., Shiraishi S., Nakamura S., Haraguchi T., Yoshida M., Uchida T.
2. 発表標題 Bitterness suppression on basic drug by chlorogenic acid evaluated by taste sensor and 1H-NMR
3. 学会等名 CRS (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 原口珠実、小島穂菜美、吉田都、内田享弘
2. 発表標題 薬物のヒト苦味受容体hTAS2Rs応答に関わる因子の探索
3. 学会等名 日本薬剤学会第132年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉田都、原口珠実、小島穂菜美、内田享弘
2. 発表標題 内服剤および注射剤に関する臨床製剤学的研究
3. 学会等名 兵庫県薬剤師会・病院薬剤師会連携1周年記念大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉田都、原口珠実、白石早祐子、中村早貴、小島穂菜美、内田享弘
2. 発表標題 味覚センサを用いた降圧薬原末2種混合試料の苦味評価
3. 学会等名 第66回日本薬学会近畿支部大会・総会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	内田 享弘 (Uchida Takahiro) (70203536)	武庫川女子大学・薬学部・教授 (34517)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関